

1/2

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年9月20日 (20.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/68914 A1

(51) 国際特許分類: C12Q 1/68, C12N 15/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/01332

(22) 国際出願日: 2001年2月23日 (23.02.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-70284 2000年3月14日 (14.03.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒101-8535 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高市昌久 (TAKAICHI, Akihisa) [JP/JP]; 〒772-0051 徳島県鳴門市鳴門町高島字中島292 Tokushima (JP). 岡本俊彦 (OKAMOTO, Toshihiko) [JP/JP]; 〒779-3122 徳島

県徳島市市府中632 Tokushima (JP). 渡辺義也 (WATANABE, Yoshinari) [JP/JP]; 〒771-1240 徳島県板野郡藍住町乙瀬字出来地5-12 Tokushima (JP). 半谷いづみ (HANYA, Izumi) [JP/JP]; 〒771-0130 徳島県徳島市川内町加賀須野463-30 Tokushima (JP).

(74) 代理人: 三枝英二, 外 (SAEGUSA, Eiji et al.); 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, CN, ID, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受理の際には再公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NUCLEIC ACID PRIMERS OF ACID-FAST BACTERIUM AND METHOD OF IDENTIFYING ACID-FAST BACTERIUM

(54) 発明の名称: 好酸菌の核酸プライマーおよび好酸菌の同定法

(57) Abstract: A technique, whereby a toxic acid-fast bacterium contaminating specimens such as drinks can be quickly and conveniently identified, comprising detecting the acid-fast bacterium in a specimen by the PCR method by using a pair of primers of a specific combination selected from among the nucleic acid primers having the base sequences represented by SEQ ID NOS:1 to 14, and then identifying the same.

(57) 要約:

本発明は、飲料などの検体に混入する有害好酸菌を迅速かつ簡便に検出および同定する技術であって、配列番号: 1 ~ 14 のいずれかで示される塩基配列からなる核酸プライマーの特定の組合せからなるプライマー対を用いて PCR 法によって検体中の好酸菌を検出し、同定する方法を提供する。

Best Available Copy

WO 01/68914 A1

FP04-0384-00WO-SB
04.12.28
SEARCH REPORT

明 細 書

好酸菌の核酸プライマーおよび好酸菌の同定法

技 術 分 野

本発明は、好酸菌、特にアリサイクロバシラス

- 5 (Alicyclobacillus) 属に属する好酸菌に特異的な配列を有する核酸プライマー、および該核酸プライマーを用いて上記好酸菌を同定する方法に関する。

背 景 技 術

- 10 液性が酸性領域にある飲料、例えば果汁ジュース、乳酸菌飲料などでは、一般に細菌は生育し難く、従ってそれらの生育し難い細菌による汚染の問題はない。しかしながら、酸性領域で生育可能な好酸菌による汚染、特に通常の加熱殺菌操作では死滅し難い耐熱性の好酸菌による汚染は、重大な問題となる。

- 15 従来より、これらの飲料において問題となる好酸菌による汚染の検査法、そのための培地などがいくつか提案されている。例えば特開平 8-140697 号公報には、耐熱性好酸菌の検出用選択培地およびその検出法が開示されている。また特開平 8-140696 号公報には、果汁中で増殖性を
20 持つ耐熱性好酸菌の検出法が提案されている。

しかしながら、これらの提案された方法における菌の検出は、いずれも菌体の脂肪酸組成の分析などの生化学

的性状を試験する方法により行われている。この性状試験には時間と手間がかかる欠点がある。その上、検出された菌体の同定は、一般的生物学的試験により行われており、この生物学的試験にも多大な時間と煩雑な工程、

5 操作が必要である。

最近、上記方法に代わって、特定の好酸菌について、その遺伝子の塩基配列の一部をプライマーとして利用して PCR 法によって DNA 解析を行い、飲料試料中に好酸菌が混入しているか否かを迅速且つ簡便に検出する方法

10 が提案された（特開平 10-234376 号公報参照）。

しかしながら、この方法に利用されるプライマーは、一つの耐熱性好酸菌が有する ω -シクロヘキサン脂肪酸生合成に関与する酵素をコードする核酸配列の一部を有するものである。このプライマーを利用する方法で検出

15 できる菌は、上記 ω -シクロヘキサン脂肪酸生合成に関与する酵素を産生する能力を有する菌に限定される。即ち、この方法は、好酸菌を検出する方法というよりはむしろ、好酸菌であるか否かとは無関係に、特定の酵素産生能を有する菌を検出する方法である。しかるに、好酸

20 菌と上記特定酵素の産生能とは直接関連はない。即ち、飲料などの汚染の原因となる好酸菌が共通して上記特定酵素産生能を有する訳ではない。一般に汚染原因となる

好酸菌の大部分は、上記特定酵素産生能を有していない。
このように、前記方法による検出結果から、飲食品の汚
染による障害、例えば不快臭などの発生を予知すること
はできない。

- 5 以上のように、前記提案された方法は、飲料などの試
料中に混入して、これを汚染するおそれのある好酸菌の
検出法としては不適切である。被検飲料検体が安全であ
るか否か（有害な好酸菌による汚染があるか否か）を確
認することはできない。しかも、この方法では好酸菌に
10 属する種の同定はできない。

本発明は、好酸菌の選択的検出方法および同定方法を
提供することを目的とする。

発 明 の 開 示

- 本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を重
15 ねた結果、飲料などの検体中に混入するおそれのある有
害な好酸菌の遺伝子に特異的な塩基配列をもとにしたプ
ライマーの合成に成功するとともに、該プライマーを利
用する PCR 法によって、検体中に混入する有害な好酸
菌を迅速かつ簡便に検出および同定し得る方法の開発に
20 も成功し、ここに本発明を完成するに至った。

本発明は、配列番号：1乃至：14のいずれかで示され
る塩基配列からなる核酸プライマーを提供する。

また本発明は、好酸菌の同定のためのプライマー対であって、下記(1)～(8)に示されるいずれかのプライマー対を提供する。

- 5 (1) 配列番号：1で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：2で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対
- (2) 配列番号：3で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：2で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対
- 10 (3) 配列番号：4で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：5で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対
- (4) 配列番号：6で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：7で示される塩基配列からなる核酸
- 15 プライマーとのプライマー対
- (5) 配列番号：6で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：8で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対
- (6) 配列番号：9で示される塩基配列からなる核酸プライ
- 20 イマーと配列番号：10で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対
- (7) 配列番号：11で示される塩基配列からなる核酸プ

ライマーと配列番号：12で示される塩基配列からなる
核酸プライマーとのプライマー対

- (8) 配列番号：13で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：14で示される塩基配列からなる
5 核酸プライマーとのプライマー対。

- 更に本発明は、上記(1)～(8)の核酸プライマー対の
少なくとも1種を用いて、PCR法によって、検体中の好
酸菌、特に飲料中の好酸菌、より詳しくはアリサイクロ
バシラス・アシドカルダリアス (*Alicyclobacillus*
10 *acidocaldarius*)、アリサイクロバシラス・アシドテレスト
リス (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) およびアリサイクロバシ
ラス・サイクロヘプタニカス (*Alicyclobacillus*
cycloheptanicus) のいずれか少なくとも1種を同定する方
法を提供する。該好酸菌の同定方法は、更に詳しくは、
15 下記(a)～(c)の態様を含んでいる。

- (a) 前記(1)、(2)および(6)に記載のプライマー対の少
なくとも1種を用いて、アリサイクロバシラス・アシド
カルダリアスを同定する態様
(b) 前記(3)および(7)に記載のプライマー対の少なく
20 とも1種を用いて、アリサイクロバシラス・アシドテレ
ストリスを同定する態様
(c) 前記(4)、(5)および(8)に記載のプライマー対の少

なくとも 1 種を用いて、アリサイクロバシラス・サイクロヘプタニカスを同定する態様

特に、本発明は一度の PCR によって、上記 (a) ~ (c) を実施する方法を提供する。この方法は、本発明プライマー対のそれぞれが、いずれも同一 PCR 条件下に前記 3 種の好酸菌のいずれかの所望の遺伝子領域を増幅させ得る性能を有することに基づいている。この方法に際して、例えば多穴プレートなどを利用してその各ウエル中に、上記 3 種の好酸菌のそれぞれに特異的な 3 種の本発明プライマー対を入れて、同一検体を PCR 反応に供すれば、一度の PCR 反応によって 3 種の好酸菌を同時に検出および同定することができる。かくして、検体中に混入するおそれのある有害な好酸菌を容易且つ迅速に確認することができる。即ち、この方法によれば、検体が汚染されているか否かを容易且つ迅速に予知することができる。

本発明による同定方法は、検体中に存在する好酸菌の DNA が本発明核酸プライマーとハイブリダイズするか否かを PCR 法にて調べることにより、検体中の好酸菌（アリサイクロバシラス属の特定微生物）の存否を決定する。

本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸などの略号による表示は、IUPAC-IUB の規定〔IUPAC-IUB

Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984))、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(特許庁編)および当該分野における慣用記号による表示法に従うものとする。

- 5 以下、本発明による核酸プライマー、プライマー対および好酸菌の同定方法につき順次詳述する。

本発明核酸プライマーは、配列番号：1～14で示されるいずれかの塩基配列からなることを必須とする。ここで、各配列番号で示される塩基配列は、基本的には、
10 好酸菌 16S リボソーム RNA の塩基配列の部分配列に対応している。

本発明者は、各種好酸菌の 16S リボソーム RNA 遺伝子に着目し、この遺伝子の特定部分の塩基配列またはこれと相同する塩基配列、即ち上記 16S リボソーム RNA
15 遺伝子の塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る塩基配列を有するプライマーを利用することにより、目的とする好酸菌を特異的に同定することが可能となることを見出した。

この 16S リボソーム RNA 遺伝子は、蛋白質合成に重要な細胞内小器官であるリボソームの構成成分であるリ
20 ボソーム RNA をコードする遺伝子であり、全ての微生物に存在する。

飲料中に混入するおそれのある有害好酸菌であるアリサイクロバシラス属微生物についても、上記 16S リボソーム RNA 遺伝子自体は知られている。例えばアリサイクロバシラス・アシドカルダリアス (*Alicyclobacillus acidocaldarius*, ATCC27009) については、EMBL/GenBank データベースに、Accession Number X60742 として登録された DSM446 株由来の 1548bp が知られている [Int. J. Syst. Bacteriol., 42 (2), 263-269 (1992)]。アリサイクロバシラス・アシドテレストリス (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) については、北大山崎助教授の博士論文に示された寄託菌 ATCC49025 の 16S リボソーム RNA (1522bp) が知られている。また、アリサイクロバシラス・サイクロヘプタニカス (*Alicyclobacillus cycloheptanicus*, ATCC49028) については、EMBL/GenBank データベースに、Accession Number X51928 として登録された 1537bp が知られている [Curr. Microbiol., 21, 325-327 (1990)]。

これら 16S リボソーム RNA は、種特異的であり、従って、この RNA 中の特定の部分配列は、前記飲料などの検体中に混入するおそれのある有害好酸菌の同定に有利に利用することができる。

本発明核酸プライマーの設計に関しては、増幅する領域の長さを 100 ~ 2000bp 程度とし、プライマーの長さは、

少なくとも 10mer、好ましくは 13 ～ 30mer 程度、より好ましくは 13 ～ 23mer 程度とするのがよい。

更に、2種のプライマー対の T_m 値（「新版 バイオ実験イラストレイテッド 本当にふえる PCR」中山広樹著、
5 秀潤社、25 頁（1998 年 6 月 1 日第 2 版発行））をできるだけ近付けることが、増幅の再現性を高めるために好ましい。プライマーの塩基配列は、可能なかぎり遺伝子の塩基配列に一致させることが、増幅する遺伝子領域への特異な結合性の向上のために好ましいが、プライマーの
10 塩基配列が完全に遺伝子の塩基配列と一致している必要はない。1もしくは数個の塩基が異なるプライマーの場合でも、遺伝子の所望の塩基配列を増幅させて好酸菌の同定を行い得る。その例としては、例えば、塩基配列：
3 および：8 に示される塩基配列からなる各プライマー
15 を例示できる。

本発明プライマーは、上記の条件を考慮して、公知の手段によって簡単に合成することができる。例えばホスホルアミダイト法またはトリエステル法によって化学合成することができる。また、市販の自動オリゴヌクレオ
20 チド合成装置、例えばパーキンエルマー社製などの自動 DNA 合成装置を用いて、 β -シアノエチル合成法を利用して合成することもできる。

二本鎖断片は、化学合成した一本鎖生成物を利用して、まずその相補鎖を合成し、次いで適当な条件下で該相補鎖を一本鎖生成物とアニーリングさせるか、または該一本鎖生成物に、適当なプライマー配列および DNA ポリ
5 メラーゼを用いて、相補鎖を付加することによって得ることができる。

かくして得られる本発明プライマーは、特定好酸菌の 16S リボソーム RNA の塩基配列からなる DNA とストリン
10 ジエントな条件下でハイブリダイズする DNA として規定することができる。ここで、ストリンジエントな条件とは、プライマーが利用される通常の条件を挙げることができる。この条件としては、0.1 % SDS を含む 0.2 × SSC 中、50 °C の条件および 0.1 % SDS を含む 1 × SSC 中、60 °C の条件を挙げることができる。

15 本発明核酸プライマーの塩基配列の具体例としては、配列番号：1 ~ 14 に示されるものを挙げることができる。ここで、配列番号：1 の塩基配列は、アリサイクロバシラス・アシドカルダリウス (*Alicyclobacillus acidocaldarius*) DSM446 の 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基
20 配列 (Accession Number X60742, 1548bp) の 161-180 番目の塩基配列に相当する。また、配列番号：3 の配列は、上記配列中その 3 番目の A を G に置換したものである。

配列番号：2の塩基配列は、アリサイクロバシラス・
アシドカルダリアス (*Alicyclobacillus acidocaldarius*) DSM446 の
16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列 (Accession
Number X60742, 1548bp) の 591-611 番目の塩基配列の相補
5 鎖配列に相当する。

配列番号：4の塩基配列は、アリサイクロバシラス・
アシドテレストリス (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) ATCC49025
の 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列 (1522bp) の
172-192 番目の塩基配列に相当する。

10 配列番号：5の塩基配列は、アリサイクロバシラス・
アシドテレストリス (*Alicyclobacillus acidoterrestris*)
ATCC49025 の 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列
(1522bp) の 587-609 番目の塩基配列の相補鎖配列に相
当する。

15 配列番号：6の塩基配列は、アリサイクロバシラス・
サイクロヘプタニカス (*Alicyclobacillus cycloheptanicus*) の 16S
リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列 (Accession Number
X51928, 1537bp) の 186-207 番目の塩基配列に相当する。

配列番号：7の塩基配列は、アリサイクロバシラス・
20 サイクロヘプタニカス (*Alicyclobacillus cycloheptanicus*) の 16S
リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列 (Accession Number
X51928, 1537bp) の 583-603 番目の塩基配列の相補鎖配列

に相当する。

配列番号：8は、上記配列番号：7の11-14番目の cccg を ttc に置換した塩基配列である。

- 配列番号：9の塩基配列は、アリサイクロバシラス・
- 5 アシドカルダリアス (*Alicyclobacillus acidocaldarius*) DSM446 の 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列 (Accession Number X60742, 1548bp) の 168-180 番目の塩基配列に相当する。

- 配列番号：10の塩基配列は、アリサイクロバシラス・
- アシドカルダリアス (*Alicyclobacillus acidocaldarius*) DSM
- 10 446 の 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列 (Accession Number X60742, 1548bp) の 591-605 番目の塩基配列の相補鎖配列に相当する。

- 配列番号：11の塩基配列は、アリサイクロバシラス・
- アシドテレストリス (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) ATCC
- 15 49025 の 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列 (1522bp) の 176-192 番目の塩基配列に相当する。

- 配列番号：12の塩基配列は、アリサイクロバシラス・
- アシドテレストリス (*Alicyclobacillus acidoterrestris*)
- ATCC49025 の 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列
- 20 (1522bp) の 587-606 番目の塩基配列の相補鎖配列に相当する。

配列番号：13の塩基配列は、アリサイクロバシラス

・サイクロヘプタニカス (*Alicyclobacillus cycloheptanicus*) の 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列 (Accession Number X51928, 1537bp) の 191-207 番目の塩基配列に相当する。

配列番号：14 の塩基配列は、アリサイクロバシラス

- 5 ・サイクロヘプタニカス (*Alicyclobacillus cycloheptanicus*) の 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列 (Accession Number X51928, 1537bp) の 583-595 番目の塩基配列の相補鎖配列に相当する。

- 10 本発明方法に利用できる上記プライマーの組合せ (フォワードプライマーとリバースプライマーとのプライマー対) としては、前記 (1) ~ (8) に記載の各プライマー対を例示できる。

本発明プライマー対の利用によれば、検体中の DNA の増幅の有無を確認することにより、好酸菌

- 15 (*Alicyclobacillus acidocaldarius*、*Alicyclobacillus acidoterrestris* および *Alicyclobacillus cycloheptanicus*) を検出して、同定することができる。

- 20 本発明検査法において、検体としては、代表的には飲料を例示できる。他の検体としては、土壌、野菜、肉、菓子などを例示できる。これらの検体は、予め適当な培地で培養して得られるコロニーから釣菌して被検菌を分離しておくのが好ましい。

本発明方法によれば、まず、上記で分離された被検菌から公知の DNA 抽出法、例えばフェノール抽出法などにより、DNA を抽出して試料とする。該 DNA 試料の一部に特定の条件下で本発明プライマー対と DNA 合成酵素を作用させて PCR 反応を行う。これによって、DNA 試料中のある特定の遺伝子領域が増幅されるので、得られる PCR 反応液を、例えば電気泳動法などに供して、増幅された DNA をサイズ別に分離して、DNA 増幅産物の存在を確認する。

かくして、本発明方法によれば、期待されるサイズの DNA 増幅産物の存在の有無を調べることにより、検体中に好酸菌が混入するか否かを判定できる。更に、上記 DNA 増幅産物の塩基配列を決定して、好酸菌の当該遺伝子領域の塩基配列と比較することによって、より信頼性の高い検出および同定が可能となる。

尚、上記 PCR 反応は、常法に従い実施することができる（例えば Science, 230, 1350 (1985) 参照）。

また、増幅させた DNA 断片の単離精製も、常法、例えばゲル電気泳動法などによることができる。

本発明プライマーおよび上記単離精製された DNA 断片の塩基配列の決定も、常法、例えばジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 74, 5463 (1977)〕、マキシム-ギ

ルバート法〔Methods in Enzymology, 65, 499 (1980)〕などに従って行うことができる。またこの塩基配列の決定は、簡便には市販のシークエンスキットなどを用いて行うこともできる。

- 5 本発明プライマーは、これをプローブとして用いて、DNA ハイブリダイゼーション法によって、好酸菌を同定することもできる。この方法は、例えば、検体から DNA 試料を上記と同様にして調製し、ポリアミド製メンブ
10 ブとハイブリダイゼーションさせることにより実施できる。この方法によれば、被検 DNA 試料がプローブと相補的であれば、上記メンブランなどの上に二本鎖が形成され、この二本鎖の標識活性を測定することにより、検
15 定中の好酸菌を同定することができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明プライマー対を用いた好酸菌同定試験における、PCR 産物の電気泳動結果を示す図面である。

図 2 は、本発明プライマー対を用いた好酸菌同定試験における、PCR 産物の電気泳動結果を示す図面である。

- 20 図 3 は、本発明プライマー対を用いた好酸菌同定試験

における、PCR産物の電気泳動結果を示す図面である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙げる。

5 実施例 1

(1) 供試菌

下記表 1 記載の各寄託菌を供試菌とした。

表 1

10	種	株
	A. acidocaldarius	IFO15652 (type strain)
	A. acidoterrestris	ATCC49025 (type strain)
	A. cycloheptanicus	IFO15310 (type strain)
	B. subtilis	ATCC6633
15	B. coagulans	IAM1115 (type strain)
	B. stearothermophilus	IAM1035
	Cl. sporogenes	IAM19235

(2) DNA 溶液の調製

20 各供試菌からインスタジーン DNA ピュアリフィケーションマトリックス (Instagene DNA Purification Matrix, Bio-

Rad) を用いて、同社マニュアルに従って、DNA 溶液を調製した。即ち、菌体 1 白金耳分を滅菌水 800 μ l に懸濁し、遠心分離 (10000G、10 分) し、上清を除去して沈殿 (菌体) を分離するという洗浄操作を、もう 1 回繰返した。次いで、得られた沈殿 (菌体) に、インスタジーン DNA ピュアリフィケーションマトリックス 200 μ l を添加し、56 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした後、攪拌 (Vortex 使用)、煮沸 (8 分) により溶菌処理して DNA 溶液を調製した。

10 (3) 本発明プライマーの設計および合成

アリサイクロバシラス・アシドカルダリウス

(*Alicyclobacillus acidocaldarius*) の 16S リボソーム RNA 遺伝子

(Accession Number X60742 (EMBL/GenBank database) [Int. J.

Syst. Bacteriol., 42 (2), 263-269 (1992)]、アリサイクロバシ

15 ラス・アシドテレストリス (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) の 16S リボソーム RNA 遺伝子 (北大山崎助教授の博士論文)

およびアリサイクロバシラス・サイクロヘプタニカス

(*Alicyclobacillus cycloheptanicus*) の 16S リボソーム RNA 遺伝

子 (Accession Number X51928 (EMBL/GenBank database) [Curr.

20 Microbiol., 21, 325-327 (1990)] の塩基配列から、下記表 2

に記載の本発明プライマーを設計し、合成した。該合成

には、自動 DNA 合成装置 (パーキンエルマー社製) を

使用した。

表 2

	種	プライマー	塩基配列	Tm(℃)
5	A. acidocaldarius	フォワード・プライマー	配列番号:1	61.6
	A. acidocaldarius	リバース・プライマー	配列番号:2	57.6
	A. acidocaldarius	フォワード・プライマー	配列番号:3	63.6
	A. acidoterrestris	フォワード・プライマー	配列番号:4	57.6
	A. acidoterrestris	リバース・プライマー	配列番号:5	54.2
10	A. cycloheptanicus	フォワード・プライマー	配列番号:6	59.5
	A. cycloheptanicus	リバース・プライマー	配列番号:7	63.3
	A. cycloheptanicus	リバース・プライマー	配列番号:8	57.6

(4) PCR 法による好酸菌の同定

15 (4-1) PCR 反応液の調製

下記表 3 の組成に従い、各試薬および前記(2)で調製した各 DNA 溶液を、0.2ml チューブ（宝酒造社製）に添加して PCR 反応液を調製した。これらの操作は氷上で行った。

表 3

成 分	添加量 (μ l/25 μ l)	終 濃 度
5U/ μ l TaKaRa Taq	0.25	1.25U/25 μ l
10xPCR buffer (MgCl ₂ free)	2.5	1 倍 濃 度
25mM MgCl ₂	2	2 mM
2.5mM dNTP 混 合 物	2	200 μ M
4 pmol/ μ l フォワード・プライマー	2	320 nM
4 pmol/ μ l リバー・スプライマー	2	320 nM
DNA template	1	-
滅菌蒸留水	13.25	-
合 計	25	-

(4-2) PCR 法

上記 (4-1) で調製した反応液を入れた各チューブをサーマルサイクラー (TaKaRa PCR Thermal Cycler MP, 宝酒造社製) 内のヒートブロックにセットし、下記表 4 に記載の温度条件で PCR 反応を行った。即ち、94℃ 4 分の熱変性工程を行った後、94℃ 30 秒、60℃ 30 秒および 72℃ 1 分のサイクルを 29 回行い、最後に 94℃ 30 秒、60℃ 30 秒および 72℃ 5 分の処理を行った。

表 4

工 程	温 度 (℃)	工 程 1	工 程 2	工 程 3
		時 間	時 間	時 間
5 熱変性	94	4分	30秒	30秒
アニーリング	60	—	30秒	30秒
伸長反応	72	—	1分	5分
サイクル数		1	29	1

- 10 尚、各プライマー対としては、(A)配列番号：1のプライマーと配列番号：2のプライマーの組合せ、(B)配列番号：3のプライマーと配列番号：2のプライマーの組合せ、(C)配列番号：4のプライマーと配列番号：5のプライマーの組合せ、(D)配列番号：6のプライマーと配列番号：7のプライマーの組合せおよび(E)配列番号：6のプライマーと配列番号：8のプライマーの組合せをそれぞれ使用した。また、試験は、1回目に上記
- 15 (A)、(C)および(D)の各プライマー対を用いて実施し、2回目に上記(B)、(C)および(E)の各プライマー対を用いて実施した。
- 20

(4-3) 電気泳動

PCR 反応終了後、反応液 25 μ l に 6 × Loading buffer

(宝酒造社製) 5 μ l を添加し、その 6 μ l を 1.5 % アガロースゲル (Agarose LO3, 宝酒造社製、1 \times TBE buffer) にて電気泳動させた (泳動装置 ; Mupid, コスモバイオ社製使用)。

5 (4-4) 観察

電気泳動後、ゲルを 1 μ g/ml エチジウムブロマイドで 20 分間染色し、水で 10 分間洗浄した。このゲルについて、紫外線 (Mini-Transiluminator, Bio-Rad) 下で泳動パターンを観察し、ポラロイド写真を撮影した。

10 (4-5) 結果

泳動結果 (撮影写真) を、図 1 および図 2 に示す。

図 1 は、1 回目の結果 (プライマー対として前記 (A)、(C) および (D) の組合せを使用) であり、図 2 は 2 回目の結果 (プライマー対として前記 (B)、(C) および (E) の組合せを使用) である。図 1 および図 2 における各レーンは次の通りである。

図 1 :

レーン M 分子量マーカー

レーン 1 *A. acidocaldarius*

20 レーン 2 *A. acidoterrestris*

レーン 3 *A. cycloheptanicus*

レーン 4 *B. subtilis*

レーン 5 *B. coagulans*

レーン 6 *B. stearothermophilus*

レーン 7 *Cl. sporogenes*

図 2 :

5 レーン M 分子量マーカー

レーン 1 *A. cycloheptanicus*

レーン 2 *A. acidoterrestris*

レーン 3 *A. acidocaldarius*

レーン 4 *B. subtilis*

10 レーン 5 *B. coagulans*

レーン 6 *B. stearothermophilus*

レーン 7 *Cl. sporogenes*

上記写真結果に基づいて、各プライマー対の利用と各供試菌が検出できるか否か（+；検出、-；検出され

15 ず）との関係を調べた。その結果を下記表 5 に示す。

表 5

	菌 種	プライマー対					
		(A)	(C)	(D)	(B)	(C)	(E)
5	A. acidocaldarius	+	—	—	+	—	—
	A. acidoterrestris	—	+	—	—	+	—
	A. cycloheptanicus	—	—	+	—	—	+
	B. subtilis	—	—	—	—	—	—
	B. coagulans	—	—	—	—	—	—
10	B. stearothermophilus	—	—	—	—	—	—
	Cl. sporogenes	—	—	—	—	—	—

図 1、図 2 および表 5 に示す結果より、本発明プライ
 マー対の利用によって、アリサイクロバシラス・アシド
 15 カルダリアス (*Alicyclobacillus acidocaldarius*)、アリサイクロ
 バシラス・アシドテレストリス (*Alicyclobacillus*
acidoterrestris) およびアリサイクロバシラス・サイクロヘ
 プタニカス (*Alicyclobacillus cycloheptanicus*) の 3 種の供試菌
 の場合に、約 450bp、430bp および 400bp の目的塩基長の
 20 PCR 産物がそれぞれ生成され、それ以外の近種の場合に
 は、PCR 産物の生成は確認できないことが明らかとなっ
 た。

このことから、本発明プライマー対のいずれかの利用によって、上記 3 種の好酸菌のいずれかが確実に検出および同定できることが判った。

また、上記試験は、同一 PCR 条件下に行われるものであることから、3 種の好酸菌のそれぞれに特異的な 3 種の本発明プライマー対を併用すれば、一度の PCR 反応によって同時にこれら 3 種の好酸菌が検出および同定できることが明らかである。このことから、本発明方法によれば、検体中に混入するおそれのある有害好酸菌を選択的に、しかも容易且つ迅速に同定でき、かくしてこれら好酸菌による検体の汚染を予知できることが明らかである。

実施例 2

(1) 供試菌

前記表 1 記載の各寄託菌を供試菌とした。

(2) DNA 溶液の調製

実施例 1 の (2) と同様にして DNA 溶液を調製した。

(3) 本発明プライマーの設計および合成

アリサイクロバシラス・アシドカルダリウス

(*Alicyclobacillus acidocaldarius*) の 16S リボソーム RNA 遺伝子 (Accession Number X60742 (EMBL/GenBank database) [Int. J. Syst. Bacteriol., 42 (2), 263-269 (1992)]、アリサイクロバシ

ラス・アシドテレストリス (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) の
 16S リボソーム RNA 遺伝子 (北大山崎助教授の博士論文)
 およびアリサイクロバシラス・サイクロヘプタニカス
 (*Alicyclobacillus cycloheptanicus*) の 16S リボソーム RNA 遺伝
 5 子 (Accession Number X51928 (EMBL/GenBank database) [Curr.
 Microbiol., 21, 325-327 (1990)]) の塩基配列から、下記表 6
 記載の本発明プライマーを設計し、合成した。該合成に
 は、自動 DNA 合成装置 (パーキンエルマー社製) を使
 用した。

10 表 6

種	プライマー	塩基配列	Tm (°C)
A. acidocaldarius	フォワードプライマー	配列番号:9	53.0
A. acidocaldarius	リバースプライマー	配列番号:10	51.2
15 A. acidoterrestris	フォワードプライマー	配列番号:11	49.8
A. acidoterrestris	リバースプライマー	配列番号:12	49.3
A. cycloheptanicus	フォワードプライマー	配列番号:13	49.8
A. cycloheptanicus	リバースプライマー	配列番号:14	53.0

20 (4) PCR 法による好酸菌の同定

(4-1) PCR 反応液の調製

前記表 3 の組成に従い、各試薬および上記 (2) で調製

した各 DNA 溶液を、0.2ml チューブ（宝酒造社製）に添加して PCR 反応液を調製した。これらの操作は氷上で行った。

(4-2) PCR 法

- 5 上記(4-1)で調製した反応液を入れた各チューブをサーマルサイクラー（TaKaRa PCR Thermal Cycler MP, 宝酒造社製）内のヒートブロックにセットし、前記表 4 に記載の温度条件で PCR 反応を行った。

- 10 尚、各プライマー対としては、(F)配列番号：9 のプライマーと配列番号：10 のプライマーの組合せ、(G)配列番号：11 のプライマーと配列番号：12 のプライマーの組合せおよび(H)配列番号：13 のプライマーと配列番号：14 のプライマーの組合せを用いた。

(4-3) 電気泳動および観察

- 15 PCR 反応終了後、反応液 25 μ l に 6 \times Loading buffer（宝酒造社製）5 μ l を添加し、その 6 μ l を 1.5 % アガロースゲル（Agarose LO3, 宝酒造社製、1 \times TBE buffer）にて電気泳動させた（泳動装置；Mupid, コスモバイオ社製使用）。

- 20 電気泳動後、ゲルを 1 μ g/ml エチジウムブロマイドで 20 分間染色し、水で 10 分間洗浄した。このゲルについて、紫外線（Mini-Transilluminator, Bio-Rad）下で泳動パターン

ンを観察し、ポラロイド写真を撮影した。

(5) 結果

泳動結果（撮影写真）を、図 3 に示す。

図 3 は、プライマー対として前記 (F)、(G) および (H) の組合せを使用した結果を左から順にそれぞれ示すものであり、各レーンは図 1 におけるそれと同じである。

上記写真結果に基づいて、各プライマー対の利用と各供試菌が検出できるか否か（+；検出、－；検出されず）との関係を調べた。その結果を下記表 7 に示す。

10 表 7

菌 種	プライマー対		
	(F)	(G)	(H)
A. acidocaldarius	+	－	－
15 A. acidoterrestris	－	+	－
A. cycloheptanicus	－	－	+
B. subtilis	－	－	－
B. coagulans	－	－	－
B. stearothermophilus	－	－	－
20 Cl. sporogenes	－	－	－

図 3 および表 7 に示す結果より、本発明プライマー対

のそれぞれの利用によって、アリサイクロバシラス・アシドカルダリウス (*Alicyclobacillus acidocaldarius*)、アリサイクロバシラス・アシドテレストリス (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) およびアリサイクロバシラス・サイクロヘ
5 プタニカス (*Alicyclobacillus cycloheptanicus*) の 3 種の供試菌
のそれぞれの場合に、約 450bp、430bp および 400bp の目
的塩基長の PCR 産物が生成されることが判った。また、
これら以外の近種では、PCR 産物の生成は確認できない
ことも明らかとなった。これらのことから、本発明プライ
10 イマーの利用によって、上記 3 種の好酸菌のそれぞれが
選択的に検出および同定できることが判った。

好酸菌による汚染のおそれがある飲料などを検体とし
て上記試験を行い、その際、例えば多穴プレートなどを
利用してその各ウエル中に、3 種の好酸菌のそれぞれに
15 特異的な 3 種の本発明プライマー対を入れて同一検体を
PCR 反応に供すれば、一度の PCR 反応によって 3 種の
好酸菌を同時に検出および同定することができる。この
ことから、本発明方法によれば、検体の好酸菌による汚
染を容易且つ迅速に判定できることが明らかである。

20

産業上の利用可能性

本発明は、好酸菌に特異的な核酸プライマーを提供す
る。本発明プライマーを利用することにより、飲料など

の検体の汚染原因菌である好酸菌を選択的に、しかも容易且つ迅速に検出および同定することができる。

5

10

15

20

請 求 の 範 囲

1. 配列番号：1乃至配列番号：14のいずれかで示される塩基配列からなる核酸プライマー。
- 5 2. 配列番号：1で示される塩基配列からなる核酸プライマー。
3. 配列番号：2で示される塩基配列からなる核酸プライマー。
- 10 4. 配列番号：3で示される塩基配列からなる核酸プライマー。
5. 配列番号：4で示される塩基配列からなる核酸プライマー。
- 15 6. 配列番号：5で示される塩基配列からなる核酸プライマー。
- 20 7. 配列番号：6で示される塩基配列からなる核酸プライマー。

8. 配列番号：7で示される塩基配列からなる核酸プライマー。

9. 配列番号：8で示される塩基配列からなる核酸プライマー。
5

10. 配列番号：9で示される塩基配列からなる核酸プライマー。

10 11. 配列番号：10で示される塩基配列からなる核酸プライマー。

12. 配列番号：11で示される塩基配列からなる核酸プライマー。

15

13. 配列番号：12で示される塩基配列からなる核酸プライマー。

14. 配列番号：13で示される塩基配列からなる核酸プライマー。
20

15. 配列番号：14で示される塩基配列からなる核酸プライマー。

イマー。

16. 好酸菌を同定するためのプライマー対であって、(1)
配列番号：1で示される塩基配列からなる核酸プライ
5 マーと配列番号：2で示される塩基配列からなる核酸
プライマーとのプライマー対、(2)配列番号：3で示
される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：
2で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプ
ライマー対、(3)配列番号：4で示される塩基配列か
10 らなる核酸プライマーと配列番号：5で示される塩基
配列からなる核酸プライマーとのプライマー対、(4)
配列番号：6で示される塩基配列からなる核酸プライ
マーと配列番号：7で示される塩基配列からなる核酸
プライマーとのプライマー対、(5)配列番号：6で示
15 される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：
8で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプ
ライマー対、(6)配列番号：9で示される塩基配列か
らなる核酸プライマーと配列番号：10で示される塩
基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対、
20 (7)配列番号：11で示される塩基配列からなる核酸プ
ライマーと配列番号：12で示される塩基配列からな
る核酸プライマーとのプライマー対および(8)配列番

号：13で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：14で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対からなる群から選択されるいずれかのプライマー対。

5

17. 配列番号：1で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：2で示される塩基配列からなる核酸プライマーとである、請求項16に記載のプライマー対。

10

18. 配列番号：3で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：2で示される塩基配列からなる核酸プライマーとである、請求項16に記載のプライマー対。

15

19. 配列番号：4で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：5で示される塩基配列からなる核酸プライマーとである、請求項16に記載のプライマー対。

20

20. 配列番号：6で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：7で示される塩基配列からなる核

酸プライマーとである、請求項 16 に記載のプライマー対。

21. 配列番号 : 6 で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号 : 8 で示される塩基配列からなる核酸プライマーとである、請求項 16 に記載のプライマー対。

22. 配列番号 : 9 で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号 : 10 で示される塩基配列からなる核酸プライマーとである、請求項 16 に記載のプライマー対。

23. 配列番号 : 11 で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号 : 12 で示される塩基配列からなる核酸プライマーとである、請求項 16 に記載のプライマー対。

24. 配列番号 : 13 で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号 : 14 で示される塩基配列からなる核酸プライマーとである、請求項 16 に記載のプライマー対。

25. 検体中の好酸菌を同定する方法であって、(1)配列番号：1で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：2で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対、(2)配列番号：3で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：2で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対、(3)配列番号：4で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：5で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対、(4)配列番号：6で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：7で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対、(5)配列番号：6で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：8で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対、(6)配列番号：9で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：10で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対、(7)配列番号：11で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：12で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対および(8)配列番号：13で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：14で示される塩基配列からなる核酸プライマー

とのプライマー対からなる群から選択される少なくとも 1 種のプライマー対を用いて PCR 法を実施する、
好酸菌の同定方法。

- 5 26. 好酸菌がアリサイクロバシラス・アシドカルダリア
スであり、用いられるプライマー対が(1)配列番号：1
で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番
号：2で示される塩基配列からなる核酸プライマーと
のプライマー対、(2)配列番号：3で示される塩基配
10 列からなる核酸プライマーと配列番号：2で示される
塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対お
よび(6)配列番号：9で示される塩基配列からなる核
酸プライマーと配列番号：10で示される塩基配列か
らなる核酸プライマーとのプライマー対からなる群か
15 ら選ばれる少なくとも 1 種である、請求項 25 に記載
の好酸菌の同定方法。

27. 好酸菌がアリサイクロバシラス・アシドテレストリ
スであり、用いられるプライマー対が(3)配列番号：4
20 で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番
号：5で示される塩基配列からなる核酸プライマーと
のプライマー対および(7)配列番号：11で示される塩

基配列からなる核酸プライマーと配列番号：12で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対からなる群から選ばれる少なくとも1種である請求項25に記載の好酸菌の同定方法。

5

28. 好酸菌がアリサイクロバシラス・サイクロヘプタニカスであり、用いられるプライマー対が(4)配列番号：6で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：7で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対、(5)配列番号：6で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：8で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対および(8)配列番号：13で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：14で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対からなる群から選ばれる少なくとも1種である請求項25に記載の好酸菌の同定方法。

10

15

29. 好酸菌がアリサイクロバシラス・アシドカルダリアス、アリサイクロバシラス・アシドテレストリスおよびアリサイクロバシラス・サイクロヘプタニカスからなる群から選ばれる少なくとも1種であり、用いられ

20

るプライマー対が下記 3 群のそれぞれに属する少なくとも 1 種ずつである請求項 25 に記載の好酸菌の同定方法。

- 1 群：(1) 配列番号：1 で示される塩基配列からなる
5 核酸プライマーと配列番号：2 で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対、(2) 配列番号：3 で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：2 で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対および(6) 配列番号：9 で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：10
10 で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対
- 2 群：(3) 配列番号：4 で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：5 で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対および(7) 配
15 列番号：11 で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：12 で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対
- 3 群：(4) 配列番号：6 で示される塩基配列からなる
20 核酸プライマーと配列番号：7 で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対、(5) 配列番号：6 で示される塩基配列からなる核酸プライマーと

配列番号：8で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対および(8)配列番号：13で示される塩基配列からなる核酸プライマーと配列番号：14で示される塩基配列からなる核酸プライマーとのプライマー対

5

30. 検体が飲料である請求項 25 に記載の好酸菌の同定方法。

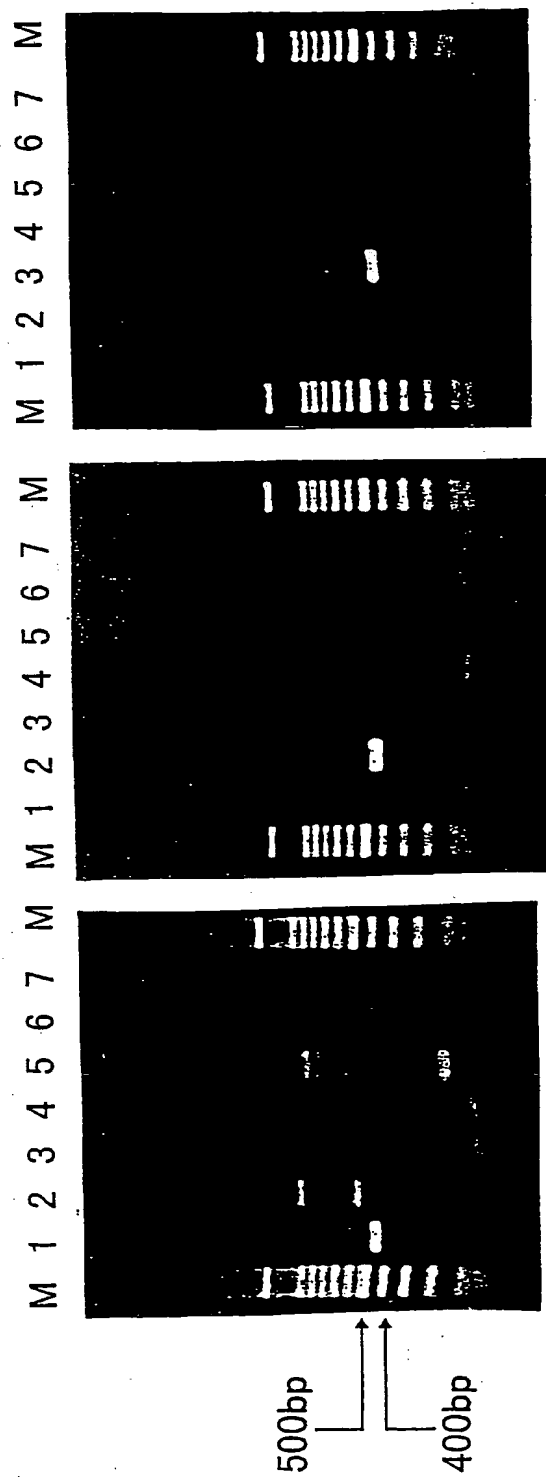
10

15

20

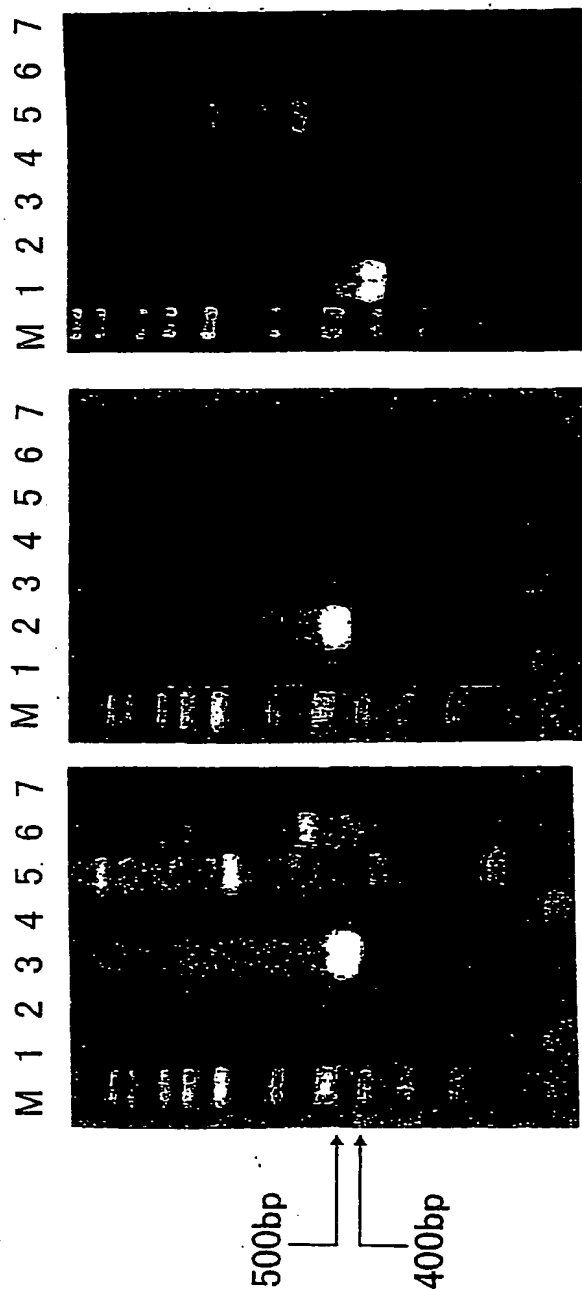
1/3

FIG. 1



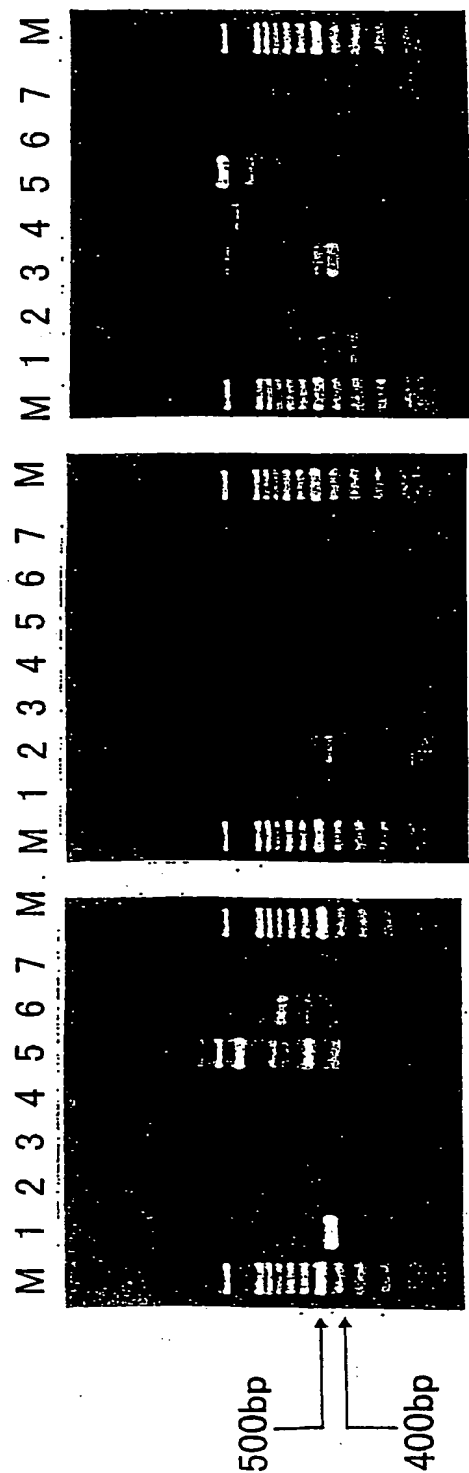
2/3

FIG. 2



3/3

FIG. 3



1/6

SEQUENCE LISTING

<110> Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Primer of acidophile bacterium and method for detection of the
microorganisms

<130> P01-09

<150> JP 2000-70284

<151> 2000-03-14

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer for A. acidocaldarius

<400> 1

ctaagccgg atagcccg

20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

2/6

<213> Artificial Sequence

<223> primer for A. acidocaldarius

<400> 2

ctttcactcc agacttgctc g

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer for A. acidocaldarius

<400> 3

ctgatgccgg atacgccgc

20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer for A. acidoterrestris

<400> 4

acgggtaggc atctacttgt g

21

<210> 5

3/6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer for A. acidoterrestris

<400> 5

tggactttca cttcagactt aca

23

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer for A. cycloheptanicus

<400> 6

cgctgggaaa ggtgcaaattg ca

22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer for A. cycloheptanicus

<400> 7

ggactttcac cccggacaca cg

22

4/6

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer for A. cycloheptanicus

<400> 8

ggactttcac ttcgacacac g

21

<210> 9

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer for A. acidocaldarius

<400> 9

cggatacgcc cgc

13

<210> 10

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer for A. acidocaldarius

5/6

<400> 10

ctccagactt gctcg

15

<210> 11

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer for A. acidoterrestris

<400> 11

gtaggcatct acttgtg

17

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer for A. acidoterrestris

<400> 12

actttcactt cagacttaca

20

<210> 13

<211> 17

<212> DNA

6/6

<213> Artificial Sequence

<223> primer for A. cycloheptanicus

<400> 13

ggaaagggtgc aaatgca

17

<210> 14

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer for A. cycloheptanicus

<400> 14

ccccggacac acg

13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01332

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)
EMBL/Genbank/DBJ/GenSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YAMAZAKI K., et al. Specific primers for detection of	1, 5, 12
Y	Alicyclobacillus acidoterrestris by RT-PCR. Letters in	2-4, 7-11, 14-18
A	Applied Microbiology November 1996, Vol.23, No.5,	, 20-22, 24-26
	p.350-354	6, 13, 19, 23, 27
Y	Genbank Accession No. X60742	1-4, 10-11,
		16-18, 22,
		25-26, 29-30
Y	Genbank Accession No. X51928	1, 7-9, 14-16,
		20-21, 24-25,
		28-30
P, Y	ALBUQUERQUE L., et al. Alicyclobacillus hesperidum sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of Sao Miguel in the Azores. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, March 2000, Vol.50, p.451-457	6, 13
Y	JP, 10-234376, A (Kirin Beverage K.K.), 08 September, 1998 (08.09.98), Claims; column 4, line 40 to column 5, line 5	1-5, 7-12,
		14-18, 20-22,
		24-26, 28-30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 July, 2001 (04.07.01)

Date of mailing of the international search report
17 July, 2001 (17.07.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01332**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	(Family: none)	6, 13, 19, 23, 27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01332

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

"It is considered that "the parts concerning *Alicyclobasillus acidocaldarius* in claims 1, 16, 25, 29 and 30 and the inventions as set forth in claims 2, 3, 4, 10, 11, 17, 18, 22 and 26", "the parts concerning *Alicyclobasillus cycloheptanicus* in claims 1, 16, 25, 29 and 30 and the inventions as set forth in claims 7, 8, 9, 14, 15, 20, 21, 24 and 28", "the parts concerning the nucleic acid primers represented by SEQ ID NOS:11 and/or 12 in claims 1, 16, 25, 27, 29 and 30 and the inventions as set forth in claims 12, 13 and 23", "the parts concerning the nucleic acid primers of SEQ ID NOS:4 and/or 5" in "claim 1", "claim 16", "claim 25", "claim 27", "claim 29" and "claim 30", "claim 5", "claim 6" and "claim 19" correspond to individual groups of inventions. Thus, it is recognized that the present application has "12" groups of inventions.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)
EMBL/Genbank/DDBJ/GenSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y — A	YAMAZAKI K., et al. Specific primers for detection of Alicyclobacillus acidoterrestris by RT-PCR. Letters in Applied Microbiology November 1996, Vol.23, No.5, p.350-354	1, 5, 12 2-4, 7-11, 14-18, 20-22, 24-26 6, 13, 19, 23, 27
Y	Genbank Accession No. X60742	1-4, 10-11, 16-18, 22, 25-26, 29-30

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.07.01

国際調査報告の発送日

17.07.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹

4B

9349

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Genbank Accession No. X51928	1, 7-9, 14-16, 20-21, 24-25, 28-30
P, Y	ALBUQUERQUE L., et al. <i>Alicyclobacillus hesperidum</i> sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of Sao Miguel in the Azores. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, March 2000, Vol.50, p.451-457	6, 13
Y	J P 10-234376 A (キリンビバレッジ株式会社) 8. 9月. 1998 (08. 09. 98), 特許請求の範囲, 第4欄40行-第5欄5行 (ファミリーなし)	1-5, 7-12, 14-18, 20-22, <u>24-26, 28-30</u>
A		6, 13, 19, 23, 27

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

「請求の範囲1, 16, 25, 29, 30のうち Alicyclobasillus acidocaldarius に関する部分、請求の範囲2, 3, 4, 10, 11, 17, 18, 22及び26に記載された発明」、「請求の範囲1, 16, 25, 29, 30のうち Alicyclobasillus cycloheptanicus に関する部分、請求の範囲7, 8, 9, 14, 15, 20, 21, 24及び28に記載された発明」、「請求の範囲1, 16, 25, 27, 29, 30のうち配列番号11及び/又は12で示される核酸プライマーに関する部分、請求の範囲12, 13及び23に記載された発明」、「請求の範囲1」「請求の範囲16」「請求の範囲25」「請求の範囲27」「請求の範囲29」「請求の範囲30」のそれぞれのうち「配列番号4及び/又は5で示される核酸プライマーに関する部分」、「請求の範囲5」、「請求の範囲6」並びに「請求の範囲19」がそれぞれ1発明と認められるから、本出願に係る発明の数は「12」と認める。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.